

## (C) WPI / DERWENT

AN - 1993-278215 [35]

AP - JP19920286908 19920930; [Previous Publ. JP5194265 ] ; JP19920286908  
19920930

CPY - YAMA

DC - B04

DR - 0135-U 0419-U

FS - CPI

IC - A61K37/54 ; A61K38/46 ; A61K47/26

MC - B04-B02C3 B07-A02 B10-C02 B12-H02 B12-M06

M2 - [01] H4 H401 H481 H8 J0 J013 J1 J173 M280 M313 M321 M332 M344 M349

M381 M391 M416 M431 M620 M630 M782 M903 M904 M910 Q624; R00419-M

- [02] F012 F013 F014 F015 F016 F017 F019 F113 F123 H4 H405 H424 H483 H5

H521 H8 K0 L8 L814 L818 L822 L831 M1 M126 M141 M280 M311 M323 M342

M373 M393 M413 M431 M510 M522 M530 M540 M630 M782 M903 M904 M910 Q624;

R00135-M

- [03] M423 M431 M782 M903 P813 V600 V616 V641

PA - (YAMA ) YAMANOUCHI PHARM CO LTD

PN - JP2971680B2 B2 19991108 DW199952 A61K38/46 007pp

- JP5194265 A 19930803 DW199335 A61K37/54 007pp

PR - JP19910282057 19911002

XA - C1993-124066

XIC - A61K-037/54 ; A61K-038/46 ; A61K-047/26

AB - J05194265 Compsn. contains opt. modified tissue plasminogen activator  
(t-PA)- citric acid (1) or its salt, and sucrose (2).- The compsn. contains 0.05-0.2 (0.06-0.15) M of citric acid, (or its  
salt), 5-10(5)% of sucrose, and pref. Freeze-dried product of t-PA-

The modified t-PA contains no K1 domain, and glu in 275-position.

- USE/ADVANTAGE - Addn. of citric acid, and sucrose improves the  
stability and solubility of t-PA, used to dissolve thrombus.- In an example a soln. of modified t-PA (1.0 mg/ml) in aq. sodium  
citrate (0.1M)- was prepd. 10% sucrose, and 0.01% Tween (RTM) were  
added to the soln. The prepd. soln. showed transparency. Soln. prepd.

from freeze-dried soln. showed same transparency with good

factor(Dwg.0/1)

CN - R00419-M R00135-M

IW - COMPOSITION CONTAIN TISSUE PLASMINOGEN ACTIVATE STABILISED CITRIC ACID  
SALT SUCROSEIKW - COMPOSITION CONTAIN TISSUE PLASMINOGEN ACTIVATE STABILISED CITRIC ACID  
SALT SUCROSE

NC - 001

OPD - 1991-10-02

ORD - 1993-08-03

PAW - (YAMA ) YAMANOUCHI PHARM CO LTD

TI - Compsn. contg. tissue plasminogen activator - stabilised with citric  
acid or salt, and sucrose

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-194265

(43)公開日 平成5年(1993)8月3日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 37/54	A C B	8314-4C		
47/26	J	7433-4C		

審査請求 未請求 請求項の数6(全 7 頁)

(21)出願番号	特願平4-286908	(71)出願人	000006677 山之内製薬株式会社 東京都中央区日本橋本町2丁目3番11号
(22)出願日	平成4年(1992)9月30日	(72)発明者	森 啓太郎 静岡県静岡市安東2-6-12
(31)優先権主張番号	特願平3-282057	(72)発明者	小林 貢 静岡県焼津市三ヶ名368-2 山之内製薬株式会社するが寮
(32)優先日	平3(1991)10月2日	(72)発明者	荒川 治之 静岡県焼津市三ヶ名368-2 山之内製薬株式会社するが寮
(33)優先権主張国	日本(JP)	(74)代理人	弁理士 長井 省三 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 組織プラスミノーゲン活性化因子含有組成物

(57)【要約】

【構成】 クエン酸またはその塩及びショ糖を含有することを特徴とする組織プラスミノーゲン活性化因子もしくは改変型組織プラスミノーゲン活性化因子含有組成物。

【効果】 組織プラスミノーゲン活性化因子および改変型組織プラスミノーゲン活性化因子が著しく安定化され、臨床上使用しうるこれらの製剤として有用である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 クエン酸またはその塩及びショ糖を含有することを特徴とする組織プラスミノゲン活性化因子または改変型組織プラスミノゲン活性化因子含有組成物。

【請求項2】 0.05～0.2Mのクエン酸またはその塩及び5～10%のショ糖を含有する組織プラスミノゲン活性化因子または改変型組織プラスミノゲン活性化因子含有組成物。

【請求項3】 0.05～0.15Mのクエン酸またはその塩及び5%のショ糖を含有する組織プラスミノゲン活性化因子または改変型組織プラスミノゲン活性化因子含有組成物の凍結乾燥品。

【請求項4】 請求項1記載の組成物で、改変型組織プラスミノゲン活性化因子がK1領域を欠失し、275位がG1uである組織プラスミノゲン活性化因子であるもの。

【請求項5】 請求項2記載の組成物で、改変型組織プラスミノゲン活性化因子がK1領域を欠失し、275位がG1uである組織プラスミノゲン活性化因子であるもの。

【請求項6】 請求項3記載の凍結乾燥品で、改変型組織プラスミノゲン活性化因子がK1領域を欠失し、275位がG1uである組織プラスミノゲン活性化因子であるもの。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、組織プラスミノゲン活性化因子（以下t-PAと略称する）または改変型組織プラスミノゲン活性化因子（以下改変型t-PAと略称する）を含有する組成物に関する。更に詳しくは、t-PAまたは改変型t-PAにクエン酸またはその塩及びショ糖を添加してなることを特徴とする、溶解性及び安定性の高められた組成物に関する。

## 【0002】

【従来の技術】t-PAは、フィブリン親和性を有し、フィブリンと結合したプラスミノゲンを活性化し極めて効率的に血栓を溶解するので、ストレプトキナーゼやウロキナーゼに代わる、出血傾向などの副作用の少ない血栓溶解剤として注目されている。更に近年このt-PAの構造を遺伝子工学的手法を用いて改変した改変型t-PAの研究も盛んに行われており、t-PAに比べin vivoにおける血中半減期が延長されることにより生物学的活性の高められた、優れた改変型分子が見い出されている。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】t-PA及び改変型t-PAはいずれも水に対して難溶な糖タンパク質であり、この性質が、水に溶解して投与する注射剤等としての製剤化を極めて困難なものにしている。また糖タンバ

ク質は一般に熱に対して不安定であり、t-PA及び改変型t-PAもまた例外ではない。このような物質を医薬品として開発するためには安定化の技術が不可欠である。t-PAおよび改変型t-PAの可溶化、安定化に関しては種々の検討がなされている。例えば、特開昭62-164632では、アルギニウムイオン含有バッファーを含み、塩素イオン濃度が約0.3M以下であるt-PA医薬組成物が開示されている。特開昭58-65218ではアルブミンを含有するt-PAの安定化方法が開示されている。

【0004】また、特表平4-503680では少なくとも0.2Mのクエン酸、アスコルビン酸、2-オキソグルタル酸、フマル酸、トリス、EDTAの群から選択される物質を含有することによるt-PA及び改変型t-PAの可溶化方法が記載されている。しかし、これらの種々の組成物は、すべての改変型t-PAを可溶化し、かつ安定化するのに適しているとはいえない。また、改変型t-PAの中には、天然型t-PAの安定化効果のある製剤処方でも、天然型t-PAほどは安定化されないものがあり、これらを安定化しかつ可溶化する製剤処方が望まれている。さらに、注射剤として用いることが可能な浸透圧比であり、凍結乾燥品としても用いることができる処方が望まれている。本発明の目的は、溶解性の低い糖タンパク質であるt-PA及び改変型t-PA組成物を医薬品として使用しえる濃度の溶液とし、かつこれらの物質の安定化された医薬品製剤を提供することにある。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、t-PAならびに改変型t-PAについて、これらの物質を安定に保つ中性pHの領域で溶解度を高める可溶化剤の検討を行った。その結果、クエン酸塩がt-PA及び改変型t-PAの溶解度を高める作用を有することが明らかとなった。しかしながらこの溶液を凍結し、-80℃で保存した後融解したところ、繊維状の不溶物が生じた。この現象を凍結時塩の濃度が上昇することによる部分的な変性によるものではないかと考え、凍結保護剤として糖類を添加し凍結保存した。その結果、ショ糖、乳糖などの糖類を添加した溶液では凍結融解を繰り返しても不溶物を生じず、また力価の低下も見られなかった。

【0006】次にt-PAならびに改変型t-PAの凍結乾燥品の安定化について、糖類、タンパク質を中心に様々な物質を用い検討を行った。その結果、先に凍結保護剤として効果を明らかにしたショ糖が凍結乾燥品とした場合にもこれらのt-PA類を著しく安定化することを見出した。さらに意外なことには、t-PAの安定化剤として知られているアルブミンを添加すると可溶化効果が下がるにもかかわらず、クエン酸塩による可溶化効果は安定化剤であるショ糖の添加により高められていることが示され、この組合せの一層の有用性が明らかとな

り、こうして本発明を完成させるに至った。以下に、本発明の組成物につき詳述する。

【0007】本発明に於てt-PAとは、ヒト由来の天然型t-PAの他、遺伝子工学的手法により得られたt-PAをも含む。また改変型t-PAは、t-PAを改良しあるいはt-PAの有する生物学的活性などを高めたものであって、本発明の安定化効果を達成するものであればいずれの改変型t-PAであってもよい。このような改変型t-PAとしては、本出願人の出願に係わる特開平2-167076、特願平1-319438など

10 【0008】すなわち、本発明の改変型t-PAには①t-PAのF領域及びG領域が欠落し、183位のGly、186位のSerがそれぞれSer及びThrに置換された改変型t-PA、②t-PAのF領域及びG領域が欠落し、119位のSerがMetに置換された改変型t-PA、③t-PAのF領域及びG領域及びK2領域が欠落し、119位のSerがMetに置換された改変型t-PAや、④t-PAの84位のCysがSerに置換された改変型t-PAなども包含される。本発明は天然型に比べ安定性が低い改変型t-PAに特に適している。

【0009】本発明の組成物は、t-PAまたは改変型t-PA、クエン酸またはその塩及びショ糖を配合することにより調整され、通常滅菌下これを水（注射用水）に溶解してt-PAまたは改変型t-PAの液剤あるいはこれをさらに凍結乾燥などの手段により乾燥して用時溶解型製剤とする。ここに、t-PAまたは改変型t-PAの濃度は少なくとも約0.1mg/ml以上であり、一方クエン酸またはその塩の濃度は0.05～0.4M、好ましくは0.05～0.2M、凍結乾燥品とする場合は好ましくは0.05～0.15M、ショ糖の濃度は溶液の場合には5～10%、凍結乾燥品とする場合には約5%である。

【0010】本発明の組成物には、医薬製剤化において通常使用される添加剤を随意配合することができる。また、用時溶解型の製剤とするときは、溶解液に緩衝剤等の添加剤を加えることも可能である。必要により添加される添加剤としては、塩化ナトリウム、塩化カリウム、リン酸一水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウムなどの無機塩類の電解質などで構成される等張化剤、ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレートやポリオキシエチレンソルビタンモノバルミテートなどのポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ソルビタンモノステアレート、ソルビタンセスキオレートなどのソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレン縮合物などの界面活性剤、セルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシ

エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシメチルエチルセルロースなどの賦形剤などが挙げられる。

【0011】これらの添加剤は適宜選択され、同種のもものが2種以上含まれていてもよい。また、本発明組成物を用時溶解型製剤とするときは溶解液の方に可溶化剤などを加えたり、溶解液を緩衝液とすることもできる。また、本発明組成物の浸透圧比は、静脈注射剤として用いることが可能な範囲である。

【0012】

【実施例】次に、本発明の実施例をあげて本発明を具体的に説明する。実施例及び実験例中、改変型t-PAは、K1領域を欠失し、275位のArgをGluに変えたt-PA（特開平2-167076）を用いた。

【0013】実施例1

改変型t-PAを1.0mg/mlの濃度で含む、10%ショ糖及び0.01%ツィーン80含有0.1Mクエン酸ナトリウム水溶液（塩酸でpH7.2に調整）を調製した。溶液は澄明であり、凍結融解後も澄明性、力価（Clot Lysis Assayにより測定）を保っていた。

【0014】実施例2

改変型t-PAを1.0mg/mlの濃度で含む5%ショ糖及び0.01%ツィーン80含有0.05、0.1または0.2Mクエン酸ナトリウム水溶液（塩酸でpH7.2に調整）を調製した。いずれも凍結融解後も澄明性、力価（Clot Lysis Assayにより測定）を保っていた。

【0015】実施例3

30 改変型t-PAを0.5mg/mlの濃度で含む、5%ショ糖及び0.01%ツィーン80含有0.1Mクエン酸ナトリウム水溶液（塩酸でpH7.2に調整）を調製し、その液をガラス製バイアルに4mlずつ分注した後、共和真空技術社製の凍結乾燥機を用いて用時溶解型の凍結乾燥品を製造した。得られた凍結乾燥品を注射用水で再溶解したところ、澄明な液となり、力価も保たれていた。

【0016】実施例4

40 改変型t-PAを0.5mg/mlの濃度で含む、5%ショ糖及び0.01%ツィーン80含有0.05Mクエン酸ナトリウム水溶液（塩酸でpH7.2に調整）を調製し、実施例3と同様に凍結乾燥品を製造した。得られた凍結乾燥品を注射用水で再溶解したところ、澄明な液となり、力価も保たれていた。

【0017】実施例5

50 t-PAを0.5mg/mlの濃度で含む、10%ショ糖及び0.01%ツィーン80含有0.1Mクエン酸ナトリウム水溶液（塩酸でpH7.2に調整）を調製した。溶液は澄明であり、凍結融解後も澄明性、力価（Clot Lysis Assayにより測定）を保って

いた。

【0018】実施例6

t-PAを0.5mg/mlの濃度で含む、5%ショ糖及び0.01%ツィーン80含有0.1Mクエン酸ナトリウム水溶液（塩酸でpH7.2に調整）を調製した。溶液は澄明であり、凍結融解後も澄明性、力価（Clo t Lysis Assay により測定）を保っていた。

【0019】

【発明の効果】t-PAまたは改変型t-PA含有組成物において、可溶化及び安定化を達成するためにクエン酸またはその塩及びショ糖を使用することにより前記の問題を解決し、高い安定性を備えた組成物の作製が可能であることを見出した。本発明による組成物は改変型t \*

\*-PAの臨床上使用しうる製剤として有用である。本発明組成物による改変型t-PAの安定性の向上は以下の試験法によって確認されたものである。

【0020】実験例1

改変型t-PA溶液に0.1Mクエン酸ナトリウム、0.1Mコハク酸ナトリウム0.1M塩化マグネシウム、0.1Mトリス、0.1Mクレアチニンまたは0.1Mサルチル酸ナトリウムを添加、各種溶液について、遠心分離、濾過を行い、上清を採取してタンパク質濃度を測定した。その結果クエン酸ナトリウムの溶液中の改変型t-PAの溶解度が他の塩溶液に比べて高いことが明らかとなった（表1）。

【0021】

【表1】

各種溶液中の改変型t-PAの溶解度

添加剤	改変型t-PA溶解度
0.1Mクエン酸ナトリウム	1 mg/ml 以上
0.1Mコハク酸ナトリウム	0.58 mg/ml
0.1M塩化マグネシウム	0.50 mg/ml
0.1Mトリス	0.20 mg/ml
0.1Mクレアチニン	0.24 mg/ml
0.1Mサルチル酸ナトリウム	測定不能

【0022】実験例2

改変型t-PAを1.0mg/mlの濃度で含む0.01%ツィーン80含有0.1Mクエン酸ナトリウム水溶液（塩酸でpH7.2に調整）を調製し、また、これに添加剤（5%ショ糖、5%乳糖または0.5MKCl）を添加した4種の溶液を調製した。これらの溶液を凍結※

※し-80℃で保存後融解したところ、0.5MKClを添加した溶液及び添加剤無添加の溶液では、繊維状の不溶物が生じたが、ショ糖または乳糖を添加した溶液は澄明に保たれていた（表2）。

【0023】

【表2】

改変型t-PAのクエン酸ナトリウム溶液における添加剤の効果

添加剤	繊維状不溶物の発生
5% ショ糖	-
5% 乳糖	-
0.5M KCl	++
無添加	+

【0024】実験例3

t-PA及び改変型t-PAをとり調製した各種濃度の★各種溶液の組成

改変型t-PA

クエン酸ナトリウム

塩酸

Tween 80

★クエン酸ナトリウムの溶液について、遠心分離、濾過を行い上清を採取してタンパク質濃度を測定した。

0.05, 0.1, 0.2, 0.3M

pH to 7.2

0.01%

【0025】その結果、クエン酸塩は0.05~0.3Mの範囲内でt-PA及び改変型t-PAの溶解度を高める作用を有していることが判明した。

☆

☆【0026】次いで改変型t-PAをとり調整した下記処方の溶液について、遠心分離、濾過を行い上清を採取してタンパク質濃度を測定した。

各種溶液の組成

改変型t-PA

クエン酸ナトリウム

ショ糖

0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3M

0, 5, 10%

塩酸  
Tween 80  
【0027】その結果、クエン酸塩は0.05~0.3 Mの範囲内でt-PA及び改変型t-PAの溶解度を高める作用を有していることが判明した。またショ糖はクエン酸塩の改変型t-PAに対する可溶化効果を濃度依存的に高める作用を有していることが判明した。但しシ\*

pH to 7.2  
0.01%

\* ヨ糖単独では可溶化効果は示さなかった(図1)。

【0028】実験例4

実施例3及び下記比較例の凍結乾燥品について種々の温度条件に放置し、安定性を調べた。

【0029】実施例3

改変型t-PA 0.5 mg/ml  
クエン酸ナトリウム 0.1 M  
ショ糖 5 %  
ツィーン80 0.01 %  
塩酸 pH to 7.2

4 ml/Vial

【0030】比較例1

改変型t-PA 0.5 mg/ml  
クエン酸ナトリウム 0.1 M  
乳糖 5 %  
ツィーン80 0.01 %  
塩酸 pH to 7.2

4 ml/Vial

【0031】比較例2

改変型t-PA 0.5 mg/ml  
クエン酸ナトリウム 0.1 M  
マルトース 5 %  
ツィーン80 0.01 %  
塩酸 pH to 7.2

4 ml/Vial

【0032】比較例3

改変型t-PA 0.5 mg/ml  
リン酸Na塩/2Na塩 0.1 M (pH 7.2)  
塩化ナトリウム 0.9 %  
グリシン 1 %  
ツィーン80 0.01 %

4 ml/Vial

【0033】

※ ※【表3】

改変型t-PA 製剤の安定性

1. 改変型t-PA ショ糖含有製剤(実施例3)

放置条件	外観	溶状	力価残存率(%)
Initial	白色	無色澄明の液	-
25°, 3M	白色	無色澄明の液	100
40°, 1M	白色	無色澄明の液	92
3M	白色	無色澄明の液	96

50° ,1M	白色	無色澄明の液	95
3M	白色	無色澄明の液	92

(注：表中、Mは月を意味する。以下同様。)

【0034】

2. 改変型 t-P A 乳糖含有製剤 (比較例 1)

放置条件	外観	溶状	力価残存率 (%)
Initial	白色	無色澄明の液	-
25° ,3M	白色	無色澄明の液	97
40° ,1M	白色	無色澄明の液	95
3M	白色	無色澄明の液	76
50° ,1M	白色	無色澄明の液	87
3M	白色	無色澄明の液	64

【0035】

3. 改変型 t-P A マルトース含有製剤 (比較例 2)

放置条件	外観	溶状	力価残存率 (%)
Initial	白色	無色澄明の液	-
25° ,3M	白色	無色澄明の液	90
40° ,1M	白色	無色澄明の液	84
3M	白色	無色澄明の液	82
50° ,1M	白色	無色澄明の液	76
3M	白色	無色澄明の液	72

【0036】

4. 改変型 t-P A グリシン含有製剤 (比較例 3)

放置条件	外観	溶状	力価残存率 (%)
Initial	白色	無色澄明の液	-
40° ,1M	白色	白濁した液	56
50° ,1M	白色	白濁した液	35

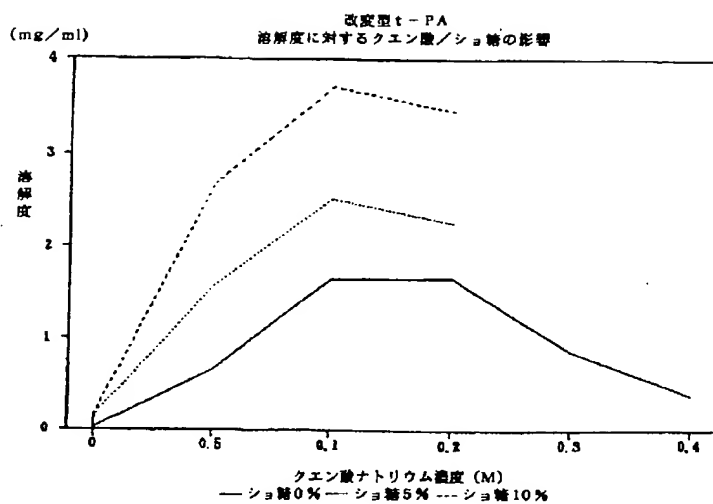
【0037】この実験例に示されるように、改変型 t-P A にショ糖を添加し凍結乾燥することにより安定性の高い製剤を作製することが可能であった。その高い安定性は、安定化剤として乳糖、マルトース、グリシンを用

いた比較例との比較より明らかである。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1はクエン酸ナトリウム及びショ糖を添加した際の改変型 t-P A の溶解度の変化を示す。

【図1】



フロントページの続き

(72)発明者 齊藤 勝実  
静岡県焼津市三ヶ名 368-2 山之内製薬  
株式会社するが寮

(72)発明者 中村 勝利  
静岡県焼津市三ヶ名 368-2 山之内製薬  
株式会社するが寮

(72)発明者 下川 誠太郎  
静岡県焼津市三ヶ名 368-2 山之内製薬  
株式会社するが寮